基于羧基化石墨烯-海藻酸钠复合材料的脱落酸电化学免疫传感器的构建及应用

董宏图[1]，周思蒙[1,2]，王清涛[2]，王　成[1]，罗　斌[1]，李爱学[1*]

（1. 北京市农林科学院信息技术研究中心，北京 100097；2. 河北工程大学 园林与生态工程学院，河北邯郸 056038）

摘　要：脱落酸（Abscisic Acid，ABA）是一种重要的植物激素，在种子和芽休眠、器官大小控制、植物衰老和死亡等发育过程中发挥作用，同时调控植物的生物与非生物胁迫。为快速、准确地测定植物体内ABA的含量，本研究开发了一种新型的ABA免疫传感器。通过在电极表面修饰羧基化石墨烯（GR-COOH）及海藻酸钠（Sodium Alginate，SA）来增加抗体的固定量，从而提高传感器的检测性能。对GR-COOH、SA、ABA抗体的浓度进行了优化，根据ABA抗体和抗原的结合导致电极阻抗发生变化的原理，实现了ABA的检测。传感器在10 pmol/L～1 μmol/L范围内与ABA浓度呈线性关系，实测的检测下限为10 pmol/L，具有较好的稳定性和选择性。进一步以感染柑橘黄龙病的脐橙为研究对象，通过制备的基于GR-COOH-SA复合材料的ABA免疫传感器检测了黄龙病菌侵染下脐橙叶片中ABA的含量变化。结果表明，脐橙感染黄龙病后，叶片中ABA的含量增加，从而表明ABA在植物的抗病反应中发挥重要作用。进一步研究了ABA合成途径中关键酶的基因*CitZEP*表达量的变化，植株感病后基因表达量升高，传感器测得的ABA含量升高与传感器的检测结果相符，表明基于GR-COOH-SA复合材料的ABA免疫传感器具有较好的实用性。

关键词：脱落酸；免疫传感器；电化学；黄龙病；羧基化石墨烯；抗体

中图分类号：TP212;TN702;TP216　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**SA202202007

引用格式：董宏图，周思蒙，王清涛，王成，罗斌，李爱学．基于羧基化石墨烯-海藻酸钠复合材料的脱落酸电化学免疫传感器的构建及应用[J]. 智慧农业(中英文), 2022, 4(1): 110-120.

DONG Hongtu, ZHOU Simeng, WANG Qingtao, WANG Cheng, LUO Bin, LI Aixue. Construction and application of a novel abscisic acid electrochemical immunosensor based on carboxylated graphene-sodium alginate nanocomposite[J]. Smart Agriculture, 2022, 4(1): 110-120. (in Chinese with English abstract)

1　引　言

脱落酸（Abscisic Acid，ABA）作为一种重要的植物激素，主要负责调节植物的生长发育[1]，调控植物果实发育成熟[2]，抑制整株植物或单个器官的生长[3]。在受到不利环境因素影响后，ABA可对下游基因进行有效地控制，进而对环境产生适应性。ABA在植物抗病反应过程中也具有重要作用，可作为直接或间接信号参与到植物的抗性反应中[4]。研究表明ABA可通过促进植物气孔关闭，阻断许多病原体的侵入[5]。因此，研究植物感病后体内ABA的含量变化对于研究植物的抗病反应非常重要。传统植物激素测定方法有生物鉴定法[6]、免疫法[7]、光谱

收稿日期：2021-08-27

基金项目：国家自然科学基金项目（21974012）

作者简介：董宏图（1988—），女，硕士，研究方向为植物抗病性检测。E-mail：donght@nercita.org.cn。

*通信作者：李爱学（1978—），女，博士，研究员，研究方向为农业传感器。E-mail：liax@nercita.org.cn。

法[8,9]等。当前常用的检测方法有超高效液相色谱法（Ultra Performance Liquid Chromatography，UPLC）、高效液相色谱（High Performance Liquid Chromatography，HPLC）和液相色谱-串联质谱法（Liquid Chromatograph Mass Spectrometer/ Mass Spectrometer，LC-MS/MS）等，但是这些检测方法操作比较复杂，并且需要大型的仪器，因此需要建立一种简单、灵敏、快速的植物体内ABA含量的检测方法。

电化学传感器具有灵敏度高、操作方便、检测快速等优点，受到了广泛青睐[10,11]。Li等[12]提出了基于纳米金修饰膜构建的ABA阻抗型免疫传感器，检测范围1.89～1.89×10^4 nmol/L，检测下限达到0.378 nmol/L。李巍等[13]研制出一种基于纳米金/硫堇修饰金电极的ABA安培免疫传感器，该传感器基于H_2O_2-HRP-硫堇催化波体系构建，检测范围1.89～3.78×10^3 nmol/L，检测下限达到0.756 nmol/L。而植物体内ABA含量甚微，一般在10～50 ng/g. FW，且在逆境下含量会迅速增多[14]。因此，为了能够更准确地检测植物体内ABA含量变化，需要进一步研发检测下限更低、检测范围更宽的ABA传感器。

石墨烯（Graphene，GR）是一种优良的二维纳米材料，具有独特的片层结构，从而具有较大的比表面积，广泛应用于传感器领域。羧基化的石墨烯（GR-COOH）具有较多的羧基，因而更有利于下一步对ABA抗体的修饰。海藻酸钠（Sodium Alginate，SA）是一种天然的线性多糖，具有较好的生物相容性、稳定性及一定的粘附性，并且其上带有大量的羧基可用于交联抗体[15]。为了增加抗体的固定量，本研究通过GR-COOH和SA的复合材料来修饰电极，并通过碳二亚胺（Carbodiimide，EDC）/羟基丁二酰亚胺（N-Hydroxy Succinimide，NHS）交联ABA的单克隆抗体，进而制备ABA免疫传感器[16-19]。利用电化学阻抗法进行ABA的检测。然后利用研制的传感器对感染柑橘黄龙病的脐橙叶片中的ABA含量进行了检测，为快速、准确获取植物体内ABA含量提供了检测方法。

2 材料与方法

2.1 化学品和材料

GR-COOH购自纳米材料科技有限公司（南京）；SA、Nafion（全氟磺酸）、ABA、ABA-Antibody（脱落酸抗体）、EDC、NHS、水杨酸、生长素、赤霉素、苹果酸、柠檬酸和琥珀酸购自Sigma-Aldrich公司（上海）；丝网印刷电极（Screen Printing Electrode，SPE）购自Xenslet生物科技有限公司；琼脂糖、10,000×GeneGreen核酸染料购自北京天根生化；2×Taq PCR StarMix、DNA Marker D2000、StarSpin快速植物DNA提取试剂盒购自北京康润诚业生物科技有限公司；RNA提取试剂盒、PrimeScript™ RT reagent Kit （Perfect Real Time）、TB Green® *Premix Ex Taq*™ II （Tli RNaseH Plus）购自Takara公司。试验所用水均为超纯水。

2.2 电镜表征

采用清华大学高分辨场发射扫描电子显微镜（ZEISS，SEM 500，德国），加速电压15 kV，获得扫描电镜（Scanning Electron Microscope，SEM）图像。

2.3 ABA免疫传感器制作方法

ABA免疫传感器使用丝网印刷电极（SPE是传统的三电极体系，由碳基工作电极和对电极，以及银/氯化银参比电极组成）制备，将不同浓度的GR-COOH溶解在1 mL不同浓度SA水溶液中，超声波处理30 min，之后添加0.5% Nafion溶液、20 mmol/L EDC、50 mmol/L NHS进行超声处理，制得GR-COOH-SA复合材料。后将复合材料滴加到电极表面，室温干燥。接着将ABA抗体滴加到电极表面，自然干燥，然后将牛血清白蛋白（Bovine Albumin，BSA）滴加在电极表面，封闭非特异性吸附位点。制作过程如图1所示。

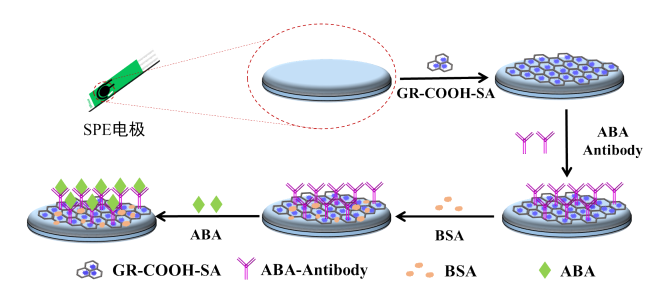


图1 ABA免疫传感器修饰过程示意图

Fig. 1 Modification process of abscisic acid immunosensor

2.4 电化学测量

试验在CHI760E电化学工作站（上海，中国）进行。循环伏安法采用电压为−0.2～0.6 V，扫描速率为0.05 V/s。将制备好的传感器在一定浓度的ABA溶液中孵育1 h，用超纯水仔细冲洗。然后将其浸入2 mmol/L铁氰化钾溶液中，使用电化学阻抗方法（Electrochemical Impedance Spectroscopy，EIS）进行检测，并通过Zview软件拟合阻抗数据。

2.5 柑橘培养及样品制备

利用研制的传感器对感染柑橘黄龙病的脐橙叶片中的ABA含量进行检测。在2020年1月，选取感染柑橘黄龙病脐橙病芽条，利用贴接法对5株健康脐橙进行接菌处理。接菌6个月后进行症状分析。利用传感器检测脐橙叶片ABA步骤如下。

（1）DNA提取与检测。选择疑似带菌脐橙，每株取1片中上部叶片，用剪刀取叶中脉，剪成1 mm左右小段，放入2 mL离心管中（加5 mm钢珠），液氮预冷之后，震荡研磨2 min，利用十六烷基三甲基溴化铵法（Cetyltrimethylammonium Bromide，CTAB）[20]进行DNA提取。根据文献报道[21]，选取引物A2/J5对疑似带菌植株DNA进行聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction，PCR）检测（表1），通过对退火温度进行55～60 ℃阶梯式扩增，最终选择条带特异性最好的58.5 ℃作为退火温度，对PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

表1 检测脐橙叶片是否感染黄龙病实验PCR反应程序条件

Table 1 Polymerase chain reaction reaction procedure and conditions for detecting whether navel orange leaves are infected with Huanglongbing

预变性	变性（35循环）	退火（35循环）	延伸（35循环）	延伸	保存
95 ℃	95 ℃	58.5 ℃	72 ℃	72 ℃	4 ℃
3 min	30 s	30 s	30 s	10 min	∞

注：35循环为变形-延伸这一过程重复35次

（2）ABA萃取。采集经PCR鉴定带菌的脐橙叶片和健康脐橙叶片各取6片，其中健康叶片为对照，向研钵中加入液氮进行研磨，待叶片磨碎呈绿色粉末后，称取1 g粉末放入10 mL离心管中，加入预冷的80%甲醇2 mL充分搅拌，在4 ℃环境下萃取浸提6 h，进行脱落酸提取。完成后，向浸提液中加入1 mL氯仿，旋涡震荡10 s，4℃、12,000 r/m离心5 min，弃上清，温室下氮气吹干，用5 mL磷酸缓冲盐溶液（Phosphate Buffered Saline，PBS）（pH7.4）溶解样品。

2.6 脐橙总RNA提取与cDNA合成

总RNA的提取参考柱式法植物RNA小量提取试剂盒（TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit）说明书。

cDNA合成参考反转录试剂盒PrimeScript™ RT Master Mix（Perfect Real Time）说明书，在RNase-free PCR管中加入200 ng RNA，2 μL 5× PrimeScript RT Master Mix，用RNase-free ddH$_2$O补至10 μL。反应程序为：37 ℃延伸15 min，85 ℃失活5 s。加入90 μL ddH$_2$O混匀，−20 ℃保存。

2.7 实时荧光定量PCR

选择ABA合成过程关键基因玉米黄质环氧化酶基因（*CitZEP*）进行荧光定量分析[22]，肌动蛋白（Actin）作为内参基因。引物序列见表2（生工生物工程（上海）股份有限公司）。20 μL反应体系：cDNA模板2 μL，2×Mix 10 μL，

10 μmol/L上下游引物各1 μL，ddH_2O 6 μL。反应程序：95 ℃预变性15 min；94 ℃变性15 s；60 ℃退火1 min，40个循环扩增，得到Ct值。

表2　脐橙叶片中ABA相关基因表达量分析试验荧光定量PCR引物序列

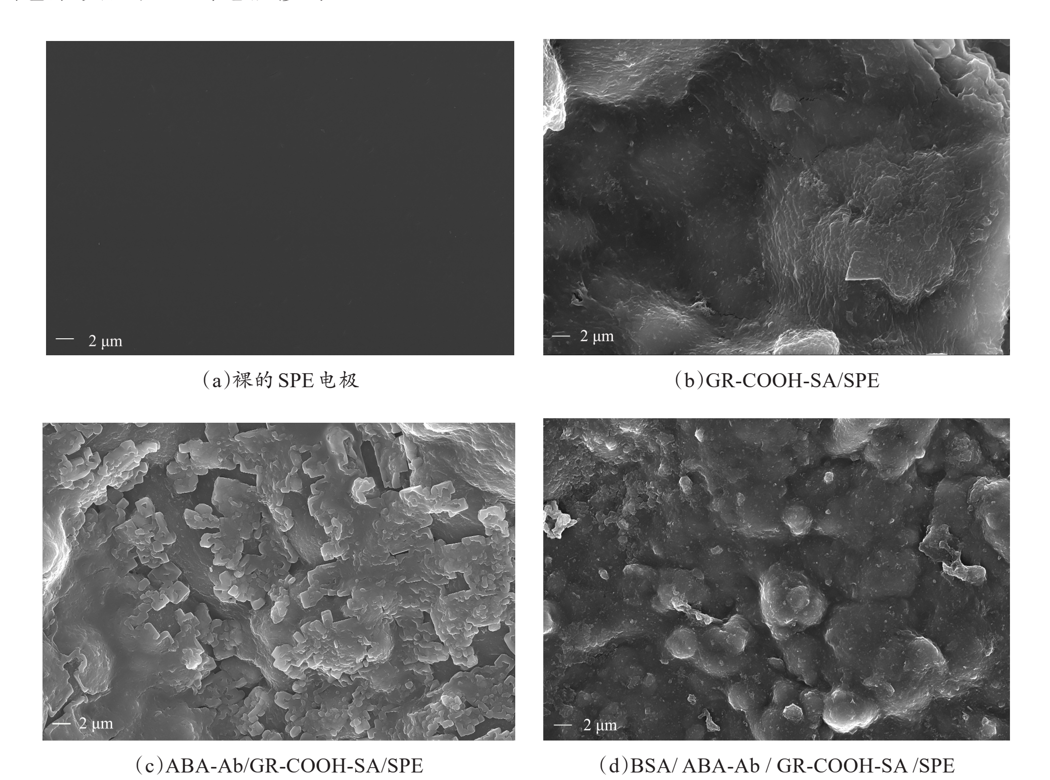
Table 2 Fluorescence quantitative polymerase chain reaction primer sequence of abscisic acid-related gene expression analysis experiment in navel orange leaves

基因名称		引物序列	退火温度/℃
CitZEP	上游引物	5'-TTTTTCTCGAACATCGATTGTGA-3'	58
	下游引物	5'-GTAGAAGGCACCATCTTTATAGCTGAT-3'	
Actin	上游引物	5'-CCAAGCAGCATGAAGATCAA-3'	60
	下游引物	5'-ATCTGCTGGAAGGTGCTGAG-3'	

3　试验结果与讨论

3.1　修饰过程的形貌分析

利用SEM对SPE电极、GR-COOH-SA/SPE电极、ABA-Ab/GR-COOH-SA/SPE电极、BSA/ABA-Ab / GR-COOH-SA /SPE电极形貌进行表征（图1）。裸的SPE电极（图2（a））表面光滑干净，无其它杂质沉积。当电极修饰上GR-COOH-SA复合材料后（图2（b）），在电极表面形成了一层致密的膜结构。对传感器进行抗体修饰后（图2（c）），电极表面出现了大量均匀分布的颗粒，表明ABA单克隆抗体已经修饰在电极表面。进一步修饰了BSA后（图2（d）），电极表面出现一些类似岛状的结构，可能是蛋白分子的增加导致发生了一定的聚集，从而表明BSA蛋白分子修饰在了电极表面。



(a)裸的SPE电极　(b)GR-COOH-SA/SPE

(c)ABA-Ab/GR-COOH-SA/SPE　(d)BSA/ ABA-Ab / GR-COOH-SA /SPE

图2　电极修饰过程的SEM表征图

Fig. 2 SEM characterization of electrode modification process

3.2 传感器检测ABA的可行性分析

图3是研究ABA免疫传感器检测实际场景，利用GR-COOH/SPE及GR-COOH-SA/SPE传感器检测ABA可行性。

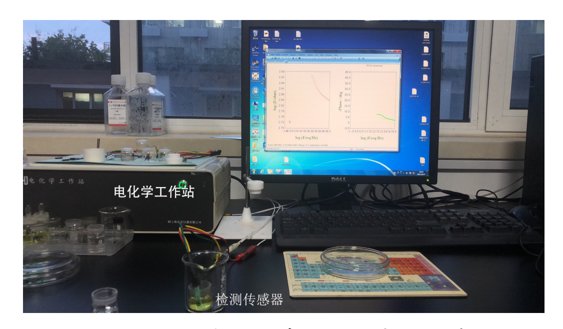


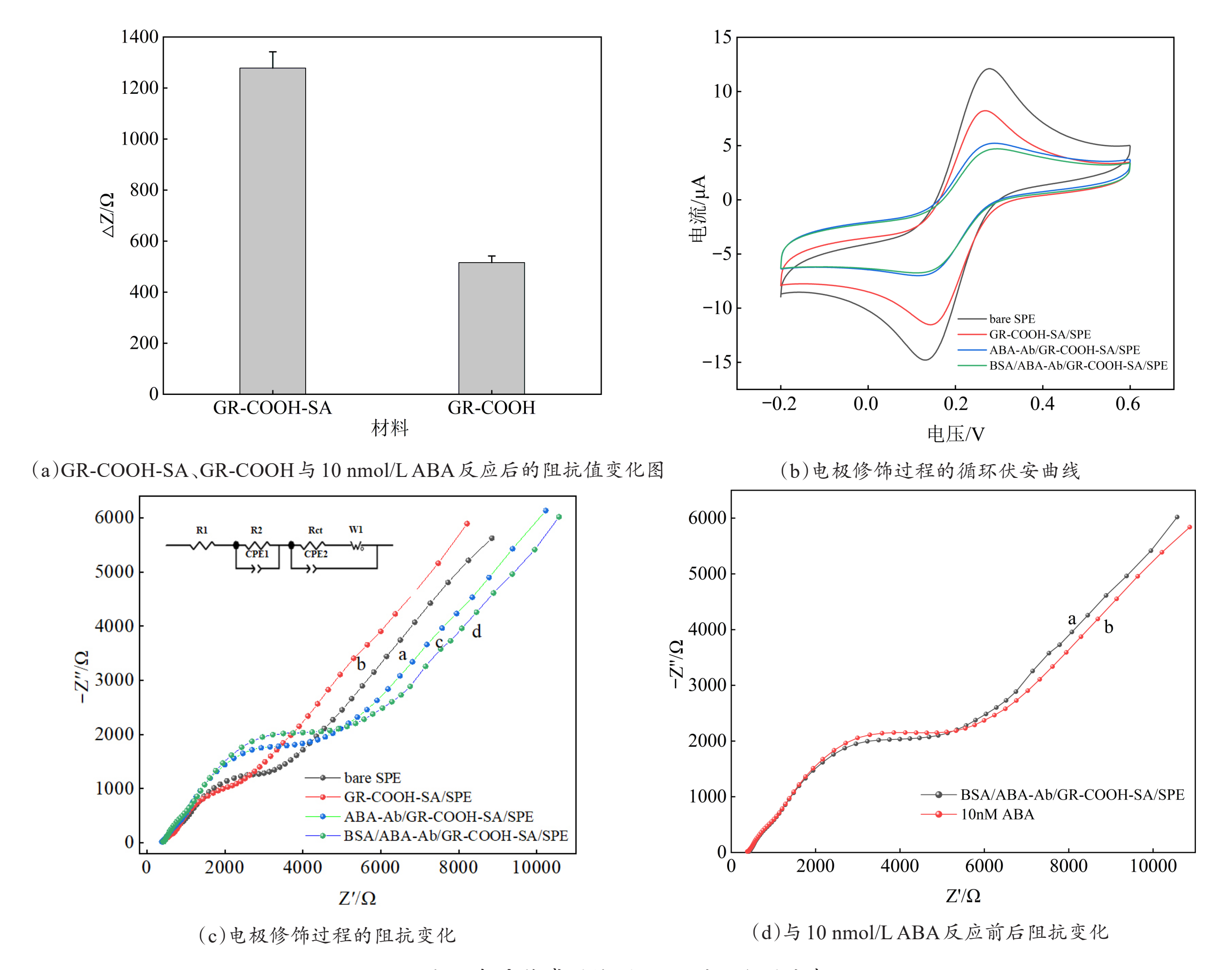
图3　ABA免疫传感器检测实际场景

Fig. 3 Actual detecting scene of abscisic acid immunosensor

将GR-COOH（1.25 mg/mL）及GR-COOH-SA（GR-COOH 1.25 mg/mL，SA 1.25 mg/mL）修饰后的电极分别浸入10 nmol/L ABA中，孵育1 h后，检测阻抗值的变化。结果表明，在10 nmol/L ABA孵育后，GR-COOH-SA/SPE电极检测的R_{ct}变化值$\triangle Z$:

$$\triangle Z=Z_1-Z_0 \quad (1)$$

其中，Z_1为电极与一定浓度ABA反应后的阻抗值，Ω；Z_0为电极修饰BSA后的阻抗值，Ω。GR-COOH-SA/SPE的$\triangle Z$约为GR-COOH/SPE电极的2.5倍，表明GR-COOH与SA两种材料的组合使传感器具有更强的检测信号，可以提高传感器的检测性能，因此在后续试验中选择GR-COOH-SA复合材料修饰电极（图4（a））。



（a）GR-COOH-SA、GR-COOH与10 nmol/L ABA反应后的阻抗值变化图

（b）电极修饰过程的循环伏安曲线

（c）电极修饰过程的阻抗变化

（d）与10 nmol/L ABA反应前后阻抗变化

图4　免疫传感器检测ABA的可行性分析

Fig. 4 Feasibility analysis of ABA detection by immunosensor

为检测免疫传感器是否制备成功，对传感器制备过程中的每个修饰环节分别用循环伏安（Cyclic Voltammetry，CV）和EIS进行了表征。CV结果如图4（b）所示，在［$Fe(CN)_6$］$^{3-/4-}$溶液中，与裸SPE电极相比（图4（b）曲线a），当电极表面修饰上GR-COOH-SA复合材料后（图4（b）曲线b），氧化还原峰电流出现了下降，这可能是由于GR-COOH-SA复合材料导电性较差，抑制了探针分子的电子转移。在孵育上ABA抗体后（图4（b）曲线c），氧化还原峰电流下降，这主要是由于抗体分子的绝缘性导致的，该结果表明抗体分子成功修饰在了电极表面。当BSA（图4（b）曲线d）依次修饰在电极表面后，峰电流继续减小。这主要是由于BSA蛋白分子的绝缘性导致的，从而表明了BSA分子的成功修饰。修饰过程的阻抗图谱如图4（c）所示，其结果可以通过拟合电路进行拟合图4（c）。在电极表面修饰GR-COOH-SA复合材料后（图4（c）曲线b），与裸电极相比（图4（c）曲线a，317.3 Ω），阻抗值增加到352.7 Ω，这主要是由于GR-COOH-SA复合材料导电性较差所致；添加ABA单克隆抗体后（图4（c）曲线c），由于抗体分子不导电，电极的阻抗显著增加，为526 Ω；进一步加入BSA蛋白后（图4（c）曲线d），阻抗进一步增加到607.1 Ω。EIS的结果与CV一致，都证明了传感器的成功构建。

3.3 制备优化

为使免疫传感器具有更好的检测性能，对GR-COOH浓度、SA浓度、ABA抗体浓度等进行了优化。复合材料中选择浓度范围为0.75～1.75 mg/mL的GR-COOH进行了优化，利用10 nmol/L ABA检测优化的效果。如图5（a）所示，SPE工作电极在GR-COOH浓度范围为0.75～1.5 mg/mL时，△Z持续增加，到1.5 mg/mL时△Z达到最大。1.5 mg/mL后GR-COOH浓度进一步增加，△Z变化趋于稳定。因此1.5 mg/mL为GR-COOH最佳浓度。

为研究SA的最佳浓度，试验中分别测试了免疫传感器在含有不同浓度SA的混合物修饰后的阻抗变化。选择SA的浓度范围为0.75～1.75 mg/mL。将5种不同浓度SA分别添加在混合修饰物中充分混匀。SA浓度范围在0.75～1 mg/mL时（图5（b）），随着浓度升高△Z呈明显增加趋势，到1 mg/mL时△Z达最大。1 mg/mL后，SA浓度进一步增加，△Z明显下降。因此，选择1 mg/mL为SA的使用浓度。

ABA抗体浓度的大小会对响应结果产生影响。试验中对ABA抗体浓度进行了优化。选择ABA抗体浓度范围为0.2～0.6 mg/mL，分别将不同浓度的抗体滴加在工作电极表面。如图5（c）所示，△Z随着ABA抗体浓度增加而增大。0.5 mg/mL时△Z达到最大。进一步增加抗体浓度，△Z减小。可能是电极表面抗体达到了平衡或饱和状态，不能容纳更多的抗体。据此认为0.5 mg/mL为制备ABA免疫传感器的最佳抗体浓度。

3.4 检测性能测试

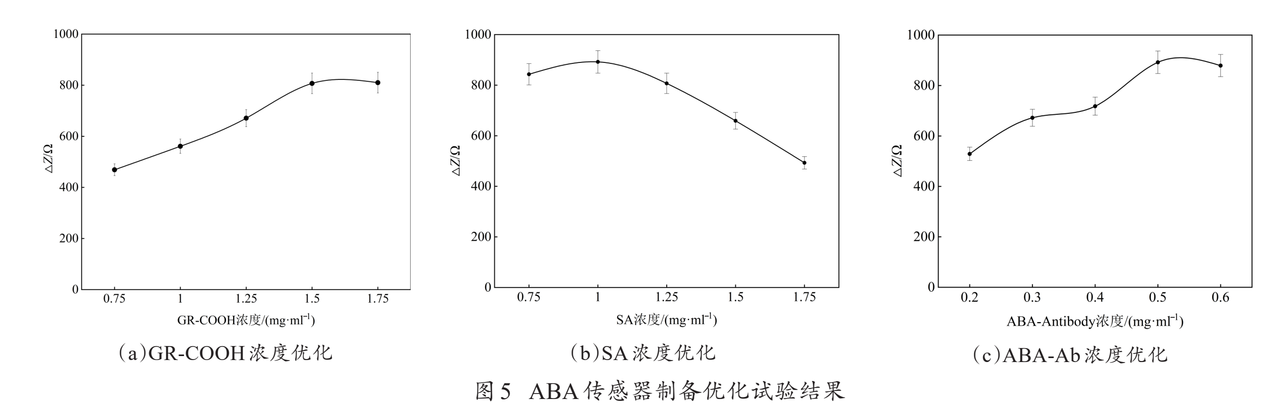
依次用不同浓度的ABA与修饰后的电极反应，然后进行阻抗测试。图6（a）显示免疫传感器的△Z随着ABA孵育浓度的增加而不断升高。图6（a）插图为取其中一段的放大图。当ABA孵育浓度范围在10 pmol/L～1 μmol/L时，该传感器的阻抗值变化与ABA的浓度呈线性相关（图6（b）），线性方程为：

$$y=103.46x+480.73 \quad (2)$$

其中，$R^2=0.99927$。检测下限的实测结果为10 pmol/L。

比较文献报道中的多种方法与本研究制备的传感器的结果（表3），发现本研究制备的ABA免疫传感器检测限较低，线性范围较宽，其检测性能获得了进一步提高。

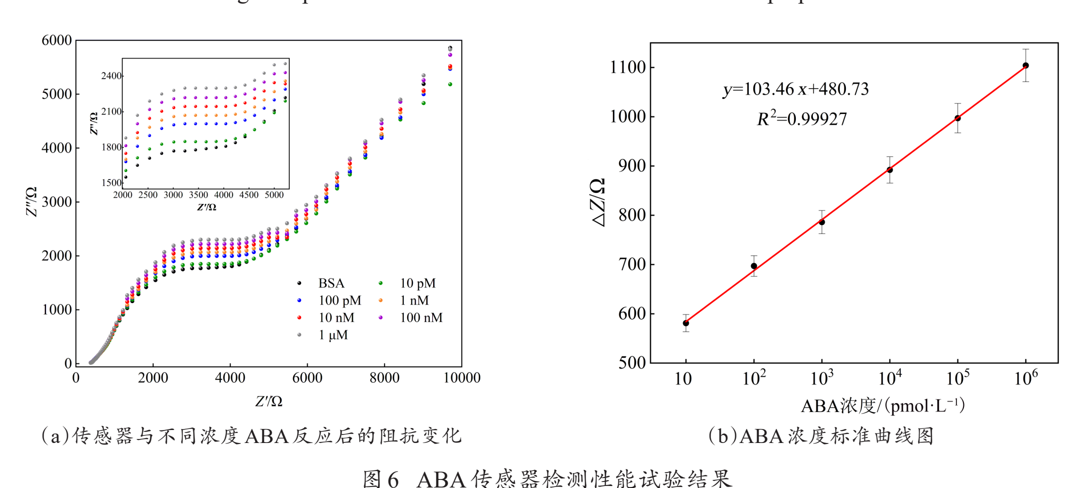
ABA检测中，可能会存在其它物质的干扰。因此，对该传感器的选择性进行了测试。选择水杨酸、生长素、赤霉素、苹果酸、柠檬酸、琥珀



(a)GR-COOH浓度优化 (b)SA浓度优化 (c)ABA-Ab浓度优化

图5 ABA传感器制备优化试验结果

Fig. 5 Optimization test results of abscisic acid sensor preparation



(a)传感器与不同浓度ABA反应后的阻抗变化 (b)ABA浓度标准曲线图

图6 ABA传感器检测性能试验结果

Fig. 6 Testing performance results of abscisic acid sensor

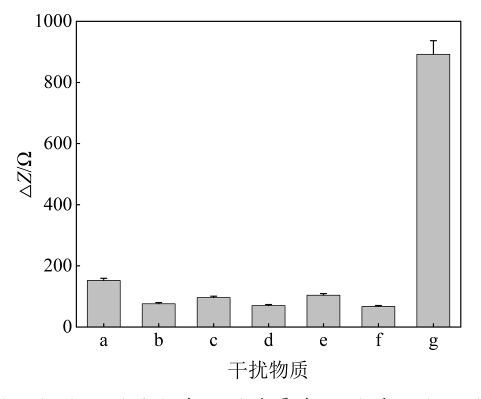
表3 不同方法检测ABA的性能对比

Table 3 Comparison of the performance of different methods for the detection of abscisic acid

检测方法	线性范围/(μmol·L⁻¹)	检测限/(μmol·L⁻¹)
高液相色谱法[10]	0.136～0.363	——
质谱法[12]	0.072～1.44	0.23
磁免疫分析法[23]	10^{-5}～10^{-2}	——
时间-电流法[24]	1.8×10^{-6}～1.5×10^{-5}	1.5×10^{-6}
比色免疫传感器[25]	5×10^{-3}～10	2.2×10^{-3}
戊二醛交联/电化学阻抗法[26]	0.0378～18.9	3.78×10^{-3}
脱落酸免疫传感器	10^{-5}～1	10^{-5}

酸和ABA分别用于与本研究制备的ABA免疫传感器反应。如图7所示，相同浓度下（10 nmol/L），ABA产生的阻抗响应显著高于其他干扰物质。表明该免疫传感器具有较高的选择性。

在同等条件下应用等浓度的ABA溶液对



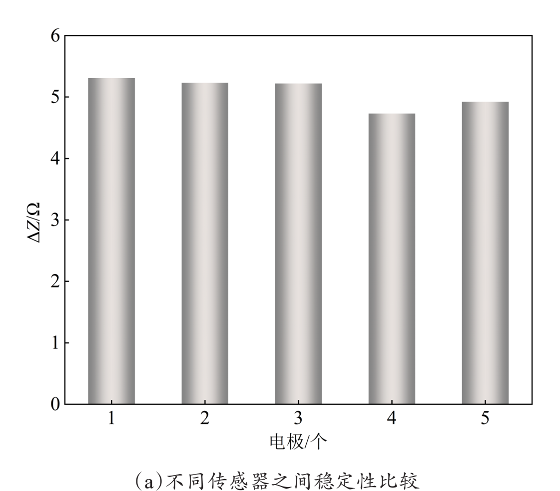
注：a为水杨酸；b为生长素；c为赤霉素；d为苹果酸；e为柠檬酸；f为琥珀酸；g为脱落酸

图7 传感器与不同干扰物质反应后的阻抗变化

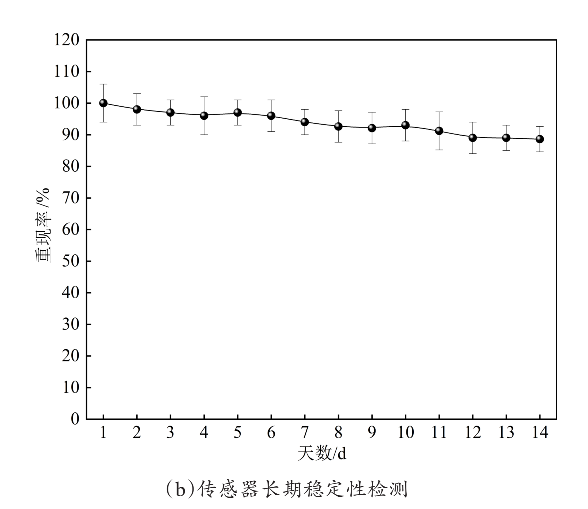
Fig. 7 Impedance change of immunosensor after reaction with different interfering substances

该传感器进行多次实验，以检测该传感器的重现性。5根ABA免疫传感器的相对标准偏差（Relative Standard Deviation, RSD）为4.87%

（图8（a））。在4 ℃条件下储存两周后，该传感器仍有88.6%的感知能力（图8（b））。表明该传感器非常稳定。



（a）不同传感器之间稳定性比较



（b）传感器长期稳定性检测

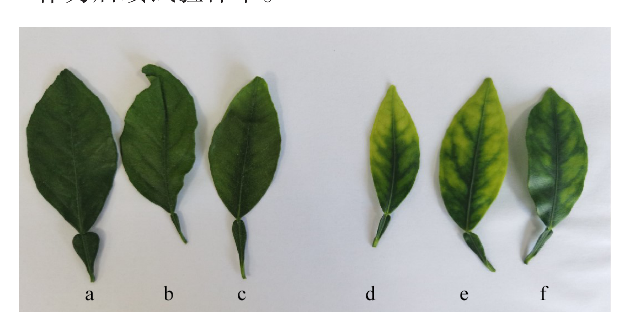
图8　ABA传感器稳定性试验

Fig. 8 Stability test of abscisic acid sensor

3.5 感染柑橘黄龙病脐橙植株叶片中ABA的含量检测

3.5.1　脐橙植株接菌情况检测

进行接菌的5株脐橙中，3株脐橙叶片具有典型的沿叶脉间隙斑驳黄化，新生叶片较小的感染柑橘黄龙病特征，初步判定为疑似带菌植株（图9）。通过对疑似感病植株DNA进行PCR扩增、琼脂糖凝胶电泳，在电泳图700 bp左右出现条带，即确定该植株接菌成功，如图10所示。植株1、2成功感染黄龙病菌，因此选定植株1、2作为后续试验样本。



注：a、b、c为健康植株叶片；d、e、f为疑似感染柑橘黄龙病叶片

图9　正常和感染柑橘黄龙病后的脐橙叶片

Fig. 9 Navel orange leaves of normal and citrus Huanglongbing infected

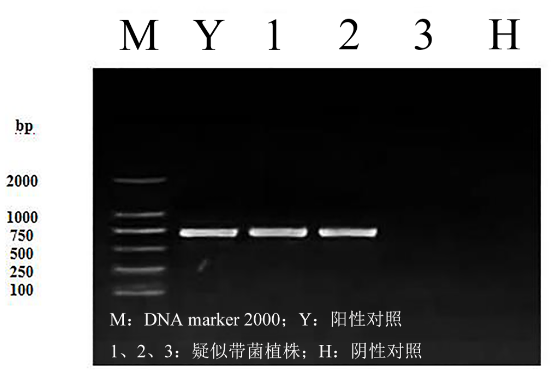


图10　利用PCR反应检测脐橙感染柑橘黄龙病情况

Fig. 10 Detection of citrus Huanglongbing infection in navel orange by polymerase chain reaction

用制备的ABA传感器对经过预处理的感染柑橘黄龙病的脐橙植株及健康植株叶片的匀浆液进行阻抗试验，每组三个重复，结果如图11所示。健康叶片的△*Z*为72 ohm，染病叶片的△*Z*为823 ohm。将两次△*Z*值代入标准曲线可得感病叶片中ABA的含量为10 nmol/L，而健康叶片中△*Z*太小，超出检测范围，不能计算出其含量。表明脐橙叶片受到病害侵染后，体内脱落酸水平呈上升趋势，此结果与之前的报道一致[27]。

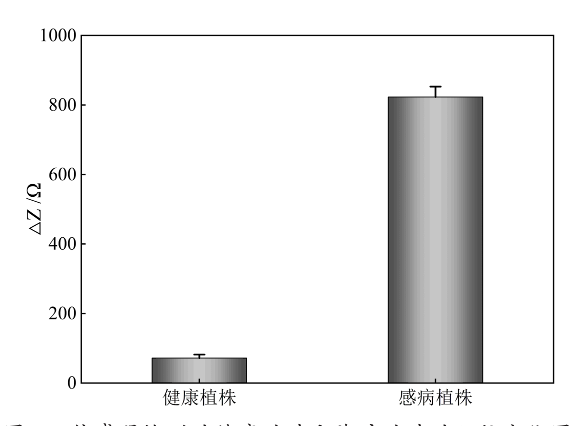


图 11　传感器检测的健康叶片和染病叶片的阻抗变化图

Fig. 11 Impedance changes of healthy leave and diseased leaves detected by the sensor

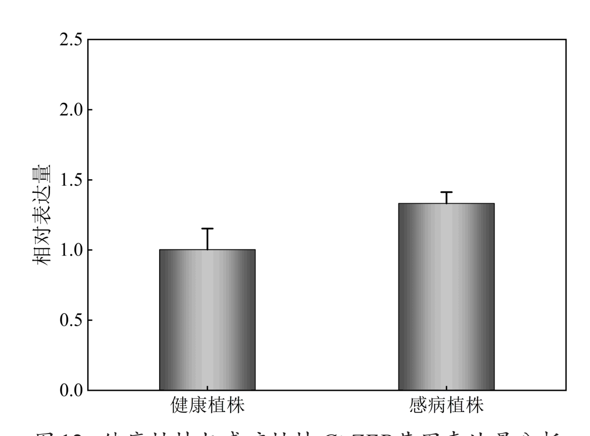


图 12　健康植株与感病植株 *CitZEP* 基因表达量分析

Fig. 12 Analysis of *CitZEP* gene expression in healthy plants and susceptible plants

本研究是第一次使用电化学传感器对柑橘黄龙病害中 ABA 的含量水平进行检测，表明 ABA 免疫传感器具有较大实际应用潜力。

3.5.2　可靠性试验

为验证试验结果的可靠性，从分子角度研究植物感病后对体内 ABA 合成的影响，本试验分别对健康及感病脐橙叶片进行取样、RNA 提取、cDNA 合成，通过荧光定量 PCR 检测 ABA 合成途径中重要酶基因 *CitZEP* 在正常及感病状态下的表达量，如图 12 所示。结果表明，健康脐橙基因 *CitZEP* 的表达量为 1.003，受到柑橘黄龙病的影响，感病脐橙叶片内 ABA 的 *CitZEP* 基因在病菌胁迫下表达量提高，基因 *CitZEP* 的表达量达到 1.332，表明病菌胁迫提高了 ABA 合成关键酶基因 *CitZEP* 的表达。可能由此引起了 ABA 含量的增加。表明 ABA 参与了脐橙感染黄龙病的过程，但具体的作用机制有待进一步研究。

此结果与通过构建测的传感器测得柑橘感染黄龙病后 ABA 含量增加的结果一致。

4　结　论

本研究研制的 ABA 电化学免疫传感器，利用 GR-COOH-SA 复合材料修饰增强了传感器检测信号强度，通过对 GR-COOH 浓度、SA 浓度、ABA 抗体浓度进行了优化，提高了免疫传感器的检测性能。

该传感器的线性范围较宽（10 pmol/L～1 μmol/L），检测限较低（10 pmol/L），具有较高的选择性及稳定性。

利用制备的该传感器对感染柑橘黄龙病脐橙样本叶片 ABA 含量进行了检测，为快速获取病害侵染后植物体内 ABA 含量提供了新手段。

参考文献：

[1] LI W, DE OLLAS C, DODD I C. Long-distance ABA transport can mediate distal tissue responses by affecting local ABA concentrations[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2018, 60(1): 16-33.

[2] WENG L, ZHAO F, LI R, et al. The zinc finger transcription factor SlZFP2 negatively regulates abscisic acid biosynthesis and fruit ripening in tomato[J]. Plant Physiology, 2015, 167(3): 931-949.

[3] LIANG C, WANG Y, ZHU Y, et al. OsNAP connects abscisic acid and leaf senescence by fine-tuning abscisic acid biosynthesis and directly targeting senescence-associated genes in rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111: 10013-10018.

[4] 王忠. 植物生理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008.

[5] MELOTTO M, UNDERWOOD W, HE S. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases[J]. Annual Review of Phytopathology, 2008, 46: 101-122.

[6] 马泳. 种子活力与萌发的生理与分子机制研究进展[J]. 农民致富之友, 2017(10): 49.
MA Y. Advances in research of physiological and molecular mechanism in seed vigor and germination[J].

China &World Economy, 2017(10): 49.
[7] MALDINEY R, LEROUX B, SABBAGH I, et al. A biotin-avidin-based enzyme immunoassay to quantify three phytohormones: Auxin, abscisic acid and zeatinriboside[J]. Journal of Immunological Methods, 1986, 90(2): 151-158.
[8] 印天寿, 陈世勇 . 赤霉素的快速分光光度测定法的研究[J]. 分析化学, 1990, 18(10): 966-969.
YIN T, CHEN S. Rapid spectrophotometric determination of gibberellins[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 1990, 18(10): 966-969.
[9] 吴少伯 . 赤霉素荧光测定的光谱特征[J]. 植物生理学报, 1990 (4): 56-58.
WU S. Characteristics of spectra in fluorimetry for GA_3[J]. Plant Physlology Communications, 1990 (4): 56-58.
[10] LOW S S, LOH H S, BOEY J S, et al. Sensitivity enhancement of Graphene/Zinc Oxide nanocomposite-based electrochemical impedance genosensor for single stranded RNA detection[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2017, 94: 365-373.
[11] LI Z, HUANG X, HU J, et al. Synthesis and electrochemical performance of three-dimensionally ordered macroporous $CoCr_2O_4$ as an anode material for lithium ion batteries[J]. Electrochimica Acta, 2017, 247: 1-11.
[12] LI Y, XIA K, WANG R, et al. An impedance immunosensor for the detection of the phytohormone abscisic acid[J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2008, 391(8): ID 2869.
[13] 李巍, 黄志刚, 李合松, 等 . 基于纳米金/硫堇修饰金电极的脱落酸安培免疫传感器的研制(英文)[J]. 传感技术学报, 2008, 21(8): 1301-1306.
LI W, HUANG Z, LI H, et al. Research of amperometric immunosensor based on gold nanoparticle/thionine modified gold electrode for the detection of abscisic acid[J]. Chinese Journal of Sensors and Actuators, 2008, 21(8): 1301-1306.
[14] 潘瑞炽 . 植物生理学(第六版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2008.
[15] DUDOLADOV A O, ALEKHINA M B, TSYGANKOV P Y. Kinetic patterns of the adsorption of air macrocomponents on nanocomposites based on calcium alginate and carbon nanotubes[J]. 2021, 95(6): 1200-1206.
[16] CAO K, JIANG Z, ZHAO J, et al. Enhanced water permeation through sodium alginate membranes by incorporating graphene oxides[J]. Journal of Membrane Scrence, 2014, 469: 272-283.
[17] DE CÁSSIA MENDONA J, ROCHA L RDA, CAPELARI T B, et al. Design and performance of novel molecularly imprinted biomimetic adsorbent for preconcentration of prostate cancer biomarker coupled to electrochemical determination by using multi-walled carbon nanotubes/Nafion/$Ni(OH)_2$-modified screen-printed electrode[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2020(878): ID 114582.
[18] KOZLOWSKA J, SIONKOWSKA A, OSYCZKA A M, et al. Stabilizing effect of EDC/NHS and DHT crosslinking on the properties of collagen/hydroxyapatite scaffolds[J]. Polymer International, 2017, 66(8): 1164-1172.
[19] ESLAHI N, SIMCHI A, MEHERJOO M, et al. Hybrid cross-linked hydrogels based on fibrous protein/block copolymers and layered silicate nanoparticles: Tunable thermosensitivity, biodegradability and mechanical durability[J]. RSC Advances, 2016, 6(67): 62944-62957.
[20] 董宏图, 王晓冬, 侯佩臣, 等 . 柑橘黄龙病早期诊断的PCR检测技术优化[J]. 浙江农业科学, 2021, 62(4): 750-754.
DONG H, WANG X, HOU P, et al. Optimization of PCR system for detection of citrus Huanglongbing[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2021, 62(4): 750-754.
[21] FUJIKAWA T, IWANAMI T. Sensitive and robust detection of citrus greening (Huanglongbing) bacterium 'Candidatus Liberibacter asiaticus' by DNA amplification with new 16SrDNA specific primers[J]. Molecular and Cellular Probes, 2012, 26: 194-197.
[22] 吴建宇, 盖钧镒 . 接种玉米矮花叶病毒对抗性不同的玉米自交系内源激素的影响[J]. 植物病理学报, 2001, 31(3): 286-287.
WU J, GAI J. Effect of inoculating maize dwarf mosaic virus on the endogenous hormones of inbred lines with different resistance[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2001, 31(3): 286-287.
[23] 周国华 . 基于纳米材料的植物激素免疫检测及受体分离分析新方法研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2014.
ZHOU G. Nano materials-based new methods for plant hormone immunoassays and receptor separations[D]. Wuhan: Wuhan University , 2014.
[24] 刘俊桃 . 超微电极电化学实时检测植物信号分子[D]. 武汉: 武汉大学, 2014.
LIU J. Real-time monitroing of plant signaling molecules by microelectrode electrochemistry[D]. Wuhan: Wuhan University , 2014.
[25] ZHOU G, LIU Y, LUO M, et al. Peptide-capped gold nanoparticle for colorimetric immunoassay of conjugated abscisic acid[J]. ACS Applied Materials & Interfac-

es, 2012, 4(9): 5010-5015.
[26] LI Q, WANG R, HUANG Z, et al. A novel impedance immunosensor based on O-phenylenediamine modified gold electrode to analyze abscisic acid[J]. Chinese Chemical Letters, 2010(4): 473-476.
[27] KUSAJIMA M, YASUDA M, KAWASHIMA A, et al. Suppressive effect of abscisic acid on systemic acquired resistance in tobacco plants[J]. Journal of General Plant Pathology, 2010, 76(2): 161-167.

Construction and Application of A Novel Abscisic Acid Electrochemical Immunosensor Based on Carboxylated Graphene-Sodium Alginate Nanocomposite

DONG Hongtu[1], ZHOU Simeng[1,2], WANG Qingtao[2], WANG Cheng[1], LUO Bin[1], LI Aixue[1*]

（1. *Research Center of Information Technology*, *Beijing Academy of Agriculture and Foreatry Sciences*, *Beijing* 100097, *China*; 2. *College of Landscape and Ecological Engineering, Hebei University of Engineering*, *Handan* 056038, *China*）

Abstract: Abscisic acid (ABA) is an important plant hormone, which can control seed and bud dormancy, organ size control, senescence and death, and participate in both biological and abiotic stress, inhibit plant growth, and participate in plant disease resistance. In order to determine the content of ABA in plants quickly and accurately, a new type of ABA immunosensor was developed. To improve the detection performance of the sensor, the detection performance of the sensor was increased by modifying GR-COOH and SA on the electrode surface. The concentration of GR-COOH , SA, and ABA-Antibody were optimized, the optimal conditions for the three materials were 1.5 mg/ml, 1.25 mg/ml and 0.5 mg/ml. The immunosensor was constructed based on the electrode impedance changes ($\triangle Z$) due to the binding reaction of ABA antibody and antigen . It was found that the sensor showed linear relationship with ABA in the response range of 10 pmol/L~1 μmol/L, R^2 was 0.99927, and the detection limit was about 10 pmol/L. The sensor also had good selectivity and stability. Using the electrochemical immunosensor, the content of ABA in navel orange leaf that have been successfully inoculated with citrus Huanglongbing by PCR was determined, and healthy plants were used as control. The test results showed that the impedance changes($\triangle Z$) of healthy leaves and diseased leaves were 72 and 823, respectively, which indicated that the level of ABA in the infected plants increased significantly. The sensor provides a tool for the detection of plant hormone levels under disease stress. The results showed that the content of ABA increased in the leaves of navel orange infected by citrus Huanglongbing, which indicated that ABA played an important role in plant disease resistance. Furthermore, the changes of gene expression of key enzymes *CitZEP* in ABA synthesis pathway were studied, The results showed that the expression of *CitZEP* increased in plants infected with Huanglongbing disease, and the results were consistent with the detection results of the sensor, which indicated that the sensor had good practicability.

Key words: abscisic acid; immunesensor; electrochemical; Huanglongbing; GR-COOH; antibody